

10/520659

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP03/08785

13.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年12月27日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-382122
[ST. 10/C]: [JP2002-382122]

出 願 人
Applicant(s): 生化学工業株式会社

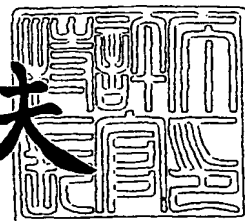


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 J200202110

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/70

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区八事富士見703番地

 【氏名】 羽瀧 脩躬

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県刈谷市井ヶ谷町広沢1 愛知教育大学内

 【氏名】 中野 博文

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県北設楽郡設楽町大字東納庫字前田4-5

 【氏名】 澤田 敏彦

【発明者】

 【住所又は居所】 香川県丸亀市土居町1-11-21

 【氏名】 藤井 園子

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県豊橋市北島町北島74-1

 【氏名】 大竹 しおり

【特許出願人】

 【識別番号】 000195524

 【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100120606

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 五丁 龍志

 【電話番号】 03-3270-0465

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-201843

【出願日】 平成14年 7月10日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 062307

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0118594

【プルーフの要否】 要

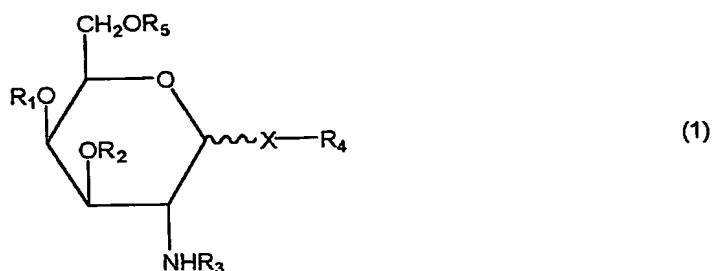
【書類名】 明細書

【発明の名称】 硫酸基転移酵素阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式 1 で表されることを特徴とするガラクトサミン誘導体。

【化 1】



式中 R_1 、 R_2 及び R_5 は各々独立に SO_3^- 又はHを示し少なくとも何れかは SO_3^- を示し、 R_3 はH、アセチル基又は SO_3^- を示し、 R_4 はH、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラルキル基を示し、XはO、S、NH、又は CH_2 を示す。

【請求項 2】 R_1 及び R_2 がHであり、 R_3 がアセチル基であり、 R_4 がアリール基であり、 R_5 が SO_3^- であることを特徴とする請求項 1 記載のガラクトサミン誘導体。

【請求項 3】 R_1 が SO_3^- であり、 R_2 及び R_5 がHであり、 R_3 がアセチル基であり、 R_4 がアリール基であることを特徴とする請求項 1 記載のガラクトサミン誘導体。

【請求項 4】 R_1 及び R_5 がHであり、 R_2 が SO_3^- であり、 R_3 がアセチル基であり、 R_4 がアリール基であることを特徴とする請求項 1 記載のガラクトサミン誘導体。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 何れか一項記載のガラクトサミン誘導体を含む硫酸基転移酵素阻害剤。

【請求項 6】 コンドロイチン硫酸の基本骨格中の4-硫酸化ガラクトサミン残基の6位炭素原子に結合したヒドロキシル基へ硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素の前記活性を阻害することを特徴とする請求項 5 記載の硫酸基

転移酵素阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は硫酸基転移酵素の阻害剤に関し、更に詳細にはグリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン硫酸の基本骨格に含まれる4-硫酸化ガラクトサミン残基の6位炭素原子に結合したヒドロキシル基を硫酸化する活性を有する硫酸基転移酵素の該活性を阻害する阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

コンドロイチン硫酸はグルクロン酸とN-アセチルガラクトサミンとが1-3グリコシド結合で結合した二糖が1-4グリコシド結合で連なった骨格（本明細書中においては「基本骨格」とも記載する）を有し、硫酸基を有する多糖である、グリコサミノグリカンの一種である。

【0003】

このようなコンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカンをはじめ、プロテオグリカン、糖タンパク質及び糖脂質は硫酸基を有しているものが多く、その生合成には多くの硫酸基転移酵素が関与している。特に非特許文献1に記載された酵素や、それによって生ずるいわゆるコンドロイチン硫酸E（非特許文献2に記載されている）等は、免疫系・神経系に深く関与していることが示唆されており、当該酵素の阻害剤は免疫抑制剤（例えばアトピー性皮膚炎、喘息、クローン病の治療薬等）や神経調節剤・疾患治療剤（神経症、アルツハイマー、躁鬱症、精神病、自律神経失調症、神経性腸炎等の治療薬、神経修復調節剤等）に応用できる可能性が高い。

【0004】

このような硫酸基転移酵素の阻害剤としては例えば非特許文献3に記載されたchlorateや非特許文献4に記載されたbrefeldinA等が存在する。しかし、前者は硫酸基転移酵素による硫酸基転移に対して非特異的な拮抗作用を示すことにより、後者は糖鎖合成の場であるゴルジ体を破壊することにより、コンドロイチン硫

酸のみならず他のグリコサミノグリカンや糖タンパク質の生合成までも強力に阻害してしまう働きがあるため、治療薬として利用できる可能性が極めて低かった。

【0005】

【非特許文献1】 J. Biol. Chem., 276(2001), pp.43894-43900

【非特許文献2】 J. Biol. Chem., 264(1989), pp.14916-14922

【非特許文献3】 Biochem. Biophys. Res. Commun., 150(1988), pp.

342-348

【非特許文献4】 J. Biol. Chem., 267(1992), pp.8802-8806

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、特定の硫酸基転移酵素に対して特異性の高い阻害活性を有する新規の化合物、及びそれを用いた新たな硫酸基転移酵素阻害剤が求められていた。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は上記課題の解決のために鋭意検討した結果、「3位、4位及び／又は6位炭素原子が硫酸化されたガラクトサミン」のアノメリック炭素にグリコシド結合でアグリコン分子が結合してなる「ガラクトサミン誘導体」が優れた硫酸基転移酵素阻害活性を有することを見だし、本発明を完成した。

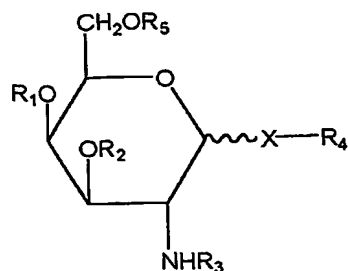
【0008】

すなわち本発明は以下の通りである。

(1) 下記式1で表されることを特徴とするガラクトサミン誘導体。

【0009】

【化2】



(1)

【0010】

式中 R_1 、 R_2 及び R_5 は各々独立に SO_3^- 又はHを示し少なくとも何れかは SO_3^- を示し、 R_3 はH、アセチル基又は SO_3^- を示し、 R_4 はH、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラルキル基を示し、XはO、S、NH、又は CH_2 を示す。

(2) R_1 及び R_2 がHであり、 R_3 がアセチル基であり、 R_4 がアリール基であり、 R_5 が SO_3^- であることを特徴とする(1)記載のガラクトサミン誘導体。

(3) R_1 が SO_3^- であり、 R_2 及び R_5 がHであり、 R_3 がアセチル基であり、 R_4 がアリール基であることを特徴とする(1)記載のガラクトサミン誘導体。

(4) R_1 及び R_5 がHであり、 R_2 が SO_3^- であり、 R_3 がアセチル基であり、 R_4 がアリール基であることを特徴とする(1)記載のガラクトサミン誘導体。

(5) (1)～(4)何れか記載のガラクトサミン誘導体を含む硫酸基転移酵素阻害剤。

(6) コンドロイチン硫酸の基本骨格中の4硫酸化ガラクトサミン残基の6位炭素原子に結合したヒドロキシル基へ硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素の前記活性を阻害することを特徴とする(5)記載の硫酸基転移酵素阻害剤。

【0011】

【発明の実施の形態】

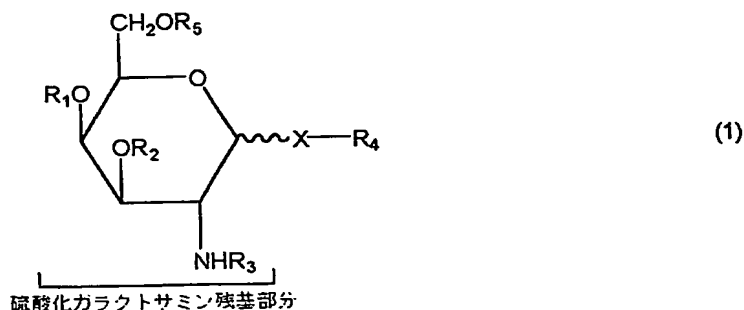
以下、発明の実施の形態により本発明を詳説する。

(1) 本発明物質

本発明物質は下記式1で表されることを特徴とするガラクトサミン誘導体である。

【0012】

【化3】



【0013】

式中 R_1 、 R_2 及び R_5 は各々独立に SO_3^- （硫酸基）又はH（水素原子）を示し、そのうち少なくとも一つは SO_3^- であり、 R_3 はH、アセチル基又は SO_3^- を示し、 R_4 はH、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラキル基を示し、XはO、S、NH、 CH_2 を示す。

【0014】

本発明物質である式1で示される硫酸化ガラクトサミン誘導体を構成する硫酸化ガラクトサミン残基部分（上記式中「硫酸化ガラクトサミン残基部分」と示した部分）は、硫酸化ガラクトサミン残基の2位のアミノ基がアセチル化又は硫酸化されていても良く、特にアセチル化されていることが好ましい。すなわち R_3 はH、アセチル基又は硫酸基が挙げられ、特にアセチル基であることが好ましい。

【0015】

また、硫酸化ガラクトサミン残基の3位、4位及び6位炭素原子に結合しているヒドロキシル基の水素原子が各々独立に硫酸基に置換していても良く、これら炭素原子の何れかが少なくとも硫酸化されていることが必要である。すなわち、上記式中 R_1 、 R_2 及び R_5 は各々独立に SO_3^- 又はHを示し、少なくとも何れかは SO_3^- であることが必要である。最も好ましくは、 R_1 、 R_2 及び R_5 の何れか1つのみが SO_3^- であり、他はHである。

【0016】

式1で示される R_4 の部分は水素原子（H）又は一般に糖の修飾や保護に用いるアグリコン分子を示し、アグリコン分子の方が水素原子よりも好ましい。そのようなアグリコン分子としてはアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル

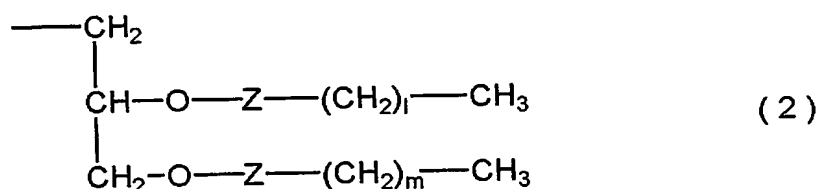
基、アリール基、又はアラルキル基が挙げられるが、アリール基及びアラルキル基が好ましく、特にアリール基が好ましい。

【0017】

上記アルキル基としては例えば炭素数1~23、好ましくは2~20の直鎖又は分枝を有するアルキル基が挙げられ、炭素数2~18の直鎖のアルキル基が好ましいアルキル基として挙げられる。また、アルキル基は、下記式2で示すようなアルキルグリセロール由来の骨格を有するアルコキシアリル基又はアシルグリセロール由来の骨格を有するアシルオキシアリル基でも良い（下記構造式中l、mは各々独立に0~18の整数を示し、Zは各々独立にメチレン基又はカルボニル基を示す）。

【0018】

【化4】



【0019】

上記アルケニル基及びアルキニル基は、炭素数1~23、好ましくは2~20であることが好ましく、炭素原子同士の二重結合、三重結合を複数有していても良い。

【0020】

上記アシル基とは、一般に-CO-Rで表される基であれば何れでも良いが、Rで表される部分の炭素数は1~23、好ましくは2~20である。尚、上記一般式においてRは上述したアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、後述のアリール基、アラルキル基から選択されるいずれかの基である。

【0021】

上記アリール基とは例えばフェニル基、ナフチル基等の芳香族炭化水素残基、又はこれらの芳香族炭化水素残基において更にアルキル基、アシル基、ヒドロキシル基(OH)、ハロゲン原子(フッ素原子(F)、塩素原子(Cl)、臭素原子(Br)、ヨウ素原子(I)等)、ニトロ基(NO₂)、硫酸基(SO₃⁻)、アルキル基、アシル基

、ケトン基等の置換基が芳香環の水素原子に置換している芳香族残基（例えばトリル基等）が例示され、この中でも特にフェニル基及びナフチル基が好ましく、特にフェニル基が好ましい。

【0022】

上記アラルキル基とは、前記アリール基（Ar）にアルキル基が結合した $\text{Ar}-(\text{CH}_2)_n-$ を一般式として表される残基であり、前記 n は1~20が好ましく、2~18がより好ましい。このようなアラルキル基としては、例えばベンジル基、フェネチル基、 α -メチルベンジル基等が例示される。

【0023】

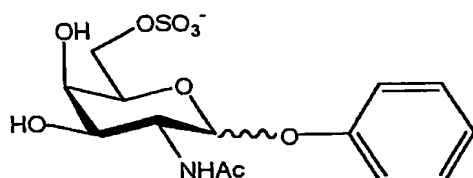
上記式1における、「硫酸化ガラクトサミン残基部分」と R_4 との結合は、「硫酸化ガラクトサミン残基部分」の硫酸化ガラクトサミン誘導体残基の1位炭素原子を介したグリコシド結合であり、これは α -グリコシド結合であっても β -グリコシド結合であっても良い（式1中波線で表記した結合）。また、本発明におけるグリコシド結合とは、例えば通常のグリコサミノグリカンの基本骨格に存在するO-グリコシド結合の他、O（酸素原子）部分がS（硫黄原子）、NH（イミノ基）、又は CH_2 （メチレン基）に各々置換したS-グリコシド結合、N-グリコシド結合、及びC-グリコシド結合も包含する。しかし、本発明物質においては特にO-グリコシド結合であることが好ましい。すなわち、上記式中XはO、S、NH及び CH_2 が例示されるが、Oが最も好ましい。なお、糖を構成する六員環はフネ型とイス型の何れもが存在しうるが、本発明物質においては安定性の面からイス型が好ましい。しかしこれに限定はされない。

【0024】

従って、最も好ましい硫酸化ガラクトサミングリコシド誘導体の例示としては、下記式3、式4、及び式5で各々示される物質が挙げられる。

【0025】

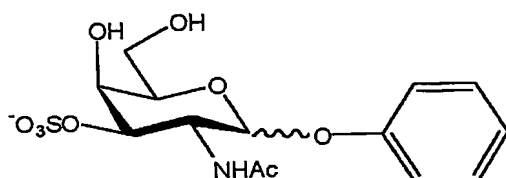
【化5】



(3)

【0026】

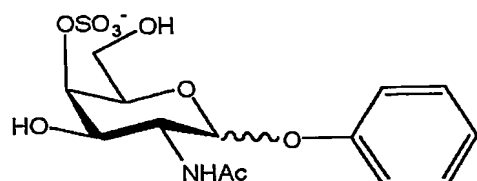
【化6】



(4)

【0027】

【化7】



(5)

【0028】

これらの式中、Acはアセチル基を示す。波線は、硫酸化ガラクトサミン残基部分へのグリコシド結合の様式である α 及び β を示す。便宜上 α 結合している上記式3で表される本発明物質を「本発明物質1」と表記し、 β 結合している上記式3で表される本発明物質を「本発明物質2」と記載する。また同様に α 結合している上記式4で表される本発明物質を「本発明物質3」と、 β 結合している上記式4で表される本発明物質を「本発明物質4」と、 α 結合している上記式5で表される物質を「本発明物質5」と、 β 結合している上記式5で表される物質を「本発明物質6」と記載する。

【0029】

本発明物質1及び2は以下の方法で調製することができる。

すなわち、フェニル2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシドを乾燥

ピリジンに溶解し、これに三酸化硫黄ピリジン錯体を添加して反応させ、6位ヒドロキシル基を選択的に硫酸化することによって合成することができる。反応後、イオン交換を行い、これを濃縮することで本発明物質1又は2を得ることができる。上記反応後、必要に応じ、イオン交換樹脂を用いたクロマトグラフィーやゲル濾過法等の分子量により化合物を分離する方法を用いて精製することが可能である。

【0030】

また、本発明物質3及び4は以下の方法で調製することができる。すなわち、2-アセトアミド4,6-O-ベンジリデン-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシドを乾燥ピリジンに溶解し、三酸化硫黄ピリジン錯体を加え、これを例えば50℃で加熱しながら4時間以上攪拌して、3位ヒドロキシル基を硫酸化した後、メタノールを加えた後、濃縮して反応生成物を得、この反応生成物を、エタノール水溶液に溶解し、この溶液にパラジウム触媒を加え、水素ガス雰囲気下で反応させてベンジリデン基を除去し、その後、セライト等を使用して濾過した後、常法に従って精製して調製することができる。

【0031】

さらに、本発明物質5及び6は、フェニル2-アセトアミド-2-デオキシ-4-O-スルホニル-6-O-ベンジル-D-ガラクトピラノシドをエタノール水溶液等に溶解し、パラジウム触媒を添加し、水素ガス雰囲気下で反応させるて6位ベンジル基を除去することによって合成することができる。反応混合物をセライト等で濾過した後、常法に従って精製して得ることができる。

【0032】

このようにして得られる本発明物質は、硫酸基転移酵素（特にJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900記載の硫酸基転移酵素）及び当該酵素の基質（硫酸基供与体及び硫酸基受容体）と共存させて、硫酸基転移酵素の酵素活性を測定することにより、下記本発明阻害剤としての作用を確認することができる。

【0033】

(2) 本発明阻害剤

本発明阻害剤は本発明物質を含み、硫酸基転移酵素の活性を阻害する作用を有

する。

本発明阻害剤が活性を阻害する硫酸基転移酵素とは硫酸基供与体から硫酸基受容体に硫酸基を転移する活性を有する酵素であり、コンドロイチンの基本骨格に存在するガラクトサミンの4位炭素原子に結合したヒドロキシル基を硫酸化する働きを有する酵素又はグリコサミノグリカンの基本骨格に存在するヘキソサミン残基の6位ヒドロキシル基に対して硫酸基を転移する酵素であることが好ましく、特に後者の酵素が好ましい。このような酵素としては特開平10-33168号、特開2001-57882号、J. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900、特開2000-60566号、W002/00889号、特開2001-61481号記載の酵素、特開平8-33483号記載の酵素が例示され、その中でも特にコンドロイチン硫酸に存在するガラクトサミン残基に対して硫酸基を転移する酵素であるコンドロイチン6-硫酸基転移酵素（特開平10-33168、特開2001-57882号、J. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900）が好ましく、最も好ましくはJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900記載の酵素（コンドロイチン硫酸に存在する4-硫酸化ガラクトサミン残基の6位ヒドロキシル基に対して硫酸基を転移する活性を有する酵素：N-アセチルガラクトサミン4-硫酸6-O-硫酸基転移酵素：以下「GalNAc4S6ST」とも記載する）が例示される。

【0034】

本発明阻害剤において「酵素活性の阻害活性」とは、本発明阻害剤を添加しない反応系（対照）での酵素活性を100%、酵素を添加しない系（陰性対照）での酵素活性を0%とした場合に、対照と比べて酵素活性が5%以上低下する場合を指称する。本発明阻害剤は特に後述の実施例2記載の阻害活性の測定方法に従って阻害活性を測定した際に、2.5mMの阻害剤濃度での反応時において5%以上、好ましくは10%以上、最も好ましくは15%以上の阻害活性を示す。

【0035】

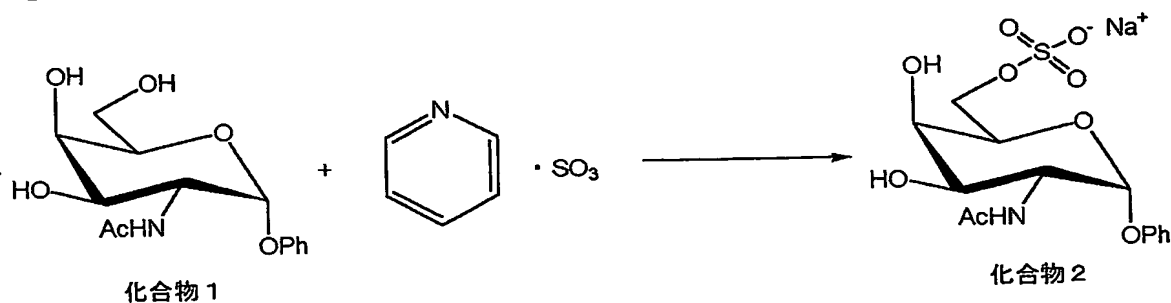
【実施例】

実施例1

本発明物質の調製

(1) 本発明物質1の調製

【化8】



【0036】

フェニル2-アセトアミド-2-デオキシ- α -D-ガラクトピラノシド（化合物1）21.7mg（0.073mmol）を乾燥ピリジン1.5cm³に溶解し、三酸化硫黄ピリジン錯体20.1mg（0.126mmol）を添加して室温で6時間攪拌した。反応混合液にメタノールを1.5cm³添加し、イオン交換樹脂Na⁺型（PARTISIL10SAX：Whatman社製）を通過させ、溶出液を減圧濃縮し、化合物2（本発明物質1）34.4mgを得た。化合物2をイオン交換樹脂（PARTISIL10SAX：Whatman社製）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、及びゲル濾過（Superdex30カラムを使用：ファルマシアバイオテック社製）により精製した。このようにして調製した本発明物質1を¹H-NMRで分析した。なお、上記化学式中「Ph」はフェニル基を示す。

【0037】

（化合物2）

¹H-NMR（400MHz、D₂O）

δ （ppm）

1.92（s, 3H, NHC₂H₅）

3.97-4.10（m, 4H）

4.23-4.27（m, 2H）

5.44（d, 1H, J=, a-H-1）

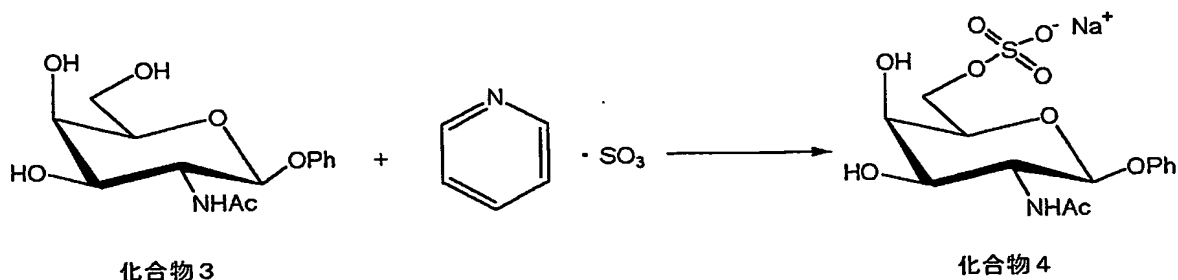
7.00-7.04（m, 3H）

7.24-7.28（m, 2H）

【0038】

（2）本発明物質2の調製

【化9】



【0039】

フェニル2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシド（化合物3）40.4mg（0.1358mmol）を乾燥ピリジン2.0cm³に溶解し、三酸化硫黄ピリジン錯体44.5mg（0.2781mmol）を添加して24℃で6時間撹拌した。反応混合液にメタノールを1.5cm³添加し、イオン交換樹脂Na⁺型（Dowex50W：ダウケミカル社製）を通過させた。溶出液を遠心分離して不用物を除去した後、減圧濃縮し、化合物4（本発明物質2）5.0mgを得た。化合物4をイオン交換樹脂（PARTISIL10SAX：Whatman社製）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、及びゲル濾過（Supaerde x30カラムを使用：ファルマシアバイオテック社製）により精製した。このようにして調製した本発明物質2を¹H-NMRで分析した。なお、上記化学式中「Ph」はフェニル基を示す。

【0040】

（化合物4）

収率：9%

¹H-NMR（400MHz、D₂O）

δ（ppm）

1.88（s, 3H, NHCOCH₃）

3.72（d, 1H, J=11.5Hz, H-3）

3.93（s, 1H, H-4）

3.97-4.15（m, 4H, H-6, H-5, H-2）

4.94（d, 1H, J=8.3Hz, β-H-1）

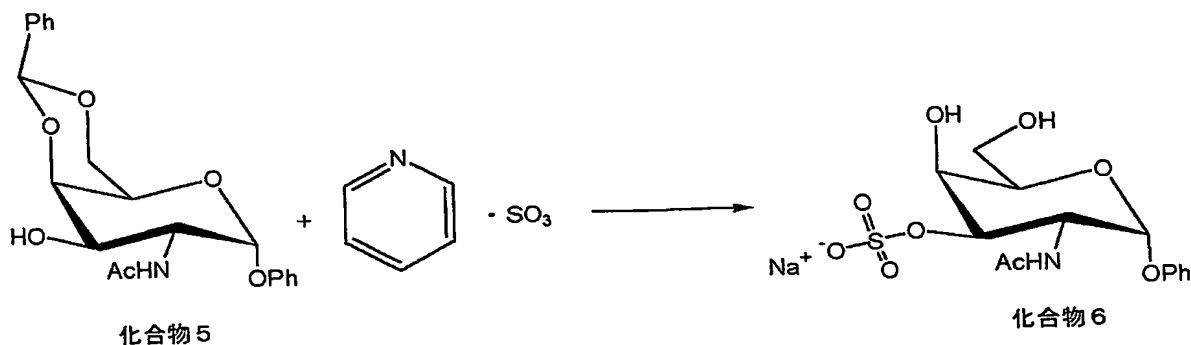
6.94-7.03（m, 3H）

7.22-7.28（m, 2H）

【0041】

(3) 本発明物質3の調製

【0042】



【0043】

2-アセトアミド4,6-O-ベンジリデン-2-デオキシ- α -D-ガラクトピラノシド (化合物5) 30.4mg (0.0788mmol) を乾燥ピリジン2.0cm³に溶解し、三酸化硫黄・ピリジン錯体134.3mg (0.8395mmol) を加えた。これを50℃で加熱しながら20時間攪拌した後、メタノールを2.0cm³を加えた。反応後、イオン交換樹脂Na⁺型に通過させ、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。

この精製物18.5mg (0.0379mmol) を、エタノール水溶液2.0cm³に溶解し、この溶液にパラジウム触媒 (パラジウム-炭) 21.2mgを加え、水素ガス雰囲気下、40℃で加熱しながら33時間攪拌した。反応後、セライトで濾過した後、電気泳動、ゲル濾過によって精製し、化合物6 (本発明物質3) を得た (3.9mg)。なお、上記化学式中「Ph」はフェニル基を示す。

【0044】

(化合物6)

収率: 26%

¹H-NMR (400MHz、D₂O) δ (ppm)1.91 (s, 3H, NHCOCH₃)

3.60 (d, 2H, J=6.1Hz, H-6)

4.01 (t, 1H, J=6.1Hz, H-5)

4.26 (d, 1H, J=3.2Hz, H-4)

4.43 (dd, 1H, $J=10.7\text{Hz}$, $J=3.7\text{Hz}$, H-2)

4.62-4.69 (m, 1H, H-3)

5.55 (d, 1H, $J=3.7\text{Hz}$, α -H-1)

6.99-7.06 (m, 3H)

7.24-7.26 (m, 2H)

^{13}C -NMR (100.4MHz, D_2O)

δ (ppm)

24.82, 50.65, 63.75, 74.41, 78.50, 99.09, 120.03, 126.06, 132.72, 158.7

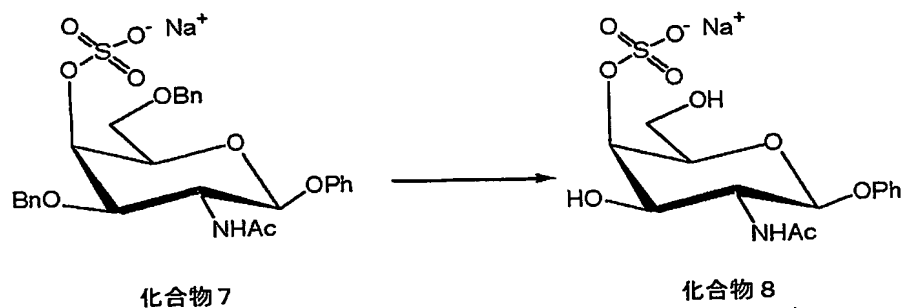
5, 177.61

【0045】

(3) 本発明物質6の調製

【0046】

【化10】



【0047】

フェニル2-アセトアミド-2-デオキシ-4-O-スルホニル-6-O-ベンジル- β -D-ガラクトピラノシド (化合物7) 16.2mg (0.0279mmol) をエタノール水溶液2.0cm³ に溶解し、パラジウム触媒 (パラジウム-炭) 30.4mgを添加した。水素ガス雰囲気下、40℃で加熱しながら21時間攪拌した。反応混合物をセライトで濾過した後、イオン交換樹脂及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。このようにして調製した化合物8 (本発明物質6) を5.2mgを得た。なお、上記化学式中「Bn」はベンジル基を示し、「Ph」はフェニル基を示す。

【0048】

(化合物8)

収率: 47%

【0049】

実施例 2

酵素活性の測定はJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900記載の方法を改変して行なった。標準反応液は50 μ l中に、2.5 μ molのイミダゾール-HCl (pH6.8)、0.5 μ molのCaCl₂、1 μ molの還元型グルタチオン、ガラクトサミン換算で25nmolのコンドロイチン硫酸A (クジラ軟骨由来: 生化学工業株式会社製)、50pmolの[³⁵S]PAPS (活性硫酸: 約 5.0×10^5 cpm: Anal. Biochem., 148(1985), 303-310に従って調製した)、及びJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900記載の方法で調製したヒト由来のGalNAc4S6STを添加した。この反応系に本発明物質1、本発明物質2、本発明物質3、本発明物質4、本発明物質5、本発明物質6を各々最終濃度50nmol、125nmol、及び250nmolとなるように添加して反応を開始した。

【0050】

反応は、反応液を37℃で20分間インキュベートして行い、反応の停止は1分間反応チューブを沸騰水中で加熱して行なった。反応停止後、1.3%酢酸カリウムを含むエタノールを3倍量添加し、³⁵Sラベルされたグリコサミノグリカンを沈殿させ、J. Biol. Chem. 268, 21968-21974に記載された方法で高速脱塩カラムを用いたゲルクロマトグラフィーを行って、その後、シンチレーションカウンターで放射能を測定した。陰性対照として酵素を添加しない反応系を用いた。

本発明物質を添加しない系の酵素活性を陽性対象として100%とし、本発明物質を添加した系での酵素反応の相対値を算出した (本発明物質1及び本発明物質2: 図1、本発明物質3及び本発明物質4: 図2、本発明物質5及び本発明物質6: 図3)。

【0051】

その結果、本発明物質1、本発明物質2共に阻害活性が観察され、特に本発明物質2の阻害活性が強かった。また本発明物質3～6に関しても、何れも阻害活性が観察されたが、本発明物質3 (α 型)と本発明物質4 (β 型)とでは本発明物質3の方が強い阻害活性を示し、本発明物質5 (α 型)と本発明物質6 (β 型)とでは本発明物質6の方が強い阻害活性を示した。

【0052】

【発明の効果】

本発明により硫酸基転移酵素の阻害活性を有するガラクトサミン誘導体及びそれを用いる硫酸基転移酵素阻害剤が提供される。

【0053】

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明物質1及び本発明物質2のGalNAc4S6ST阻害活性を示す図である。縦縞は本発明物質1を示し、黒塗りは本発明物質2を示す。

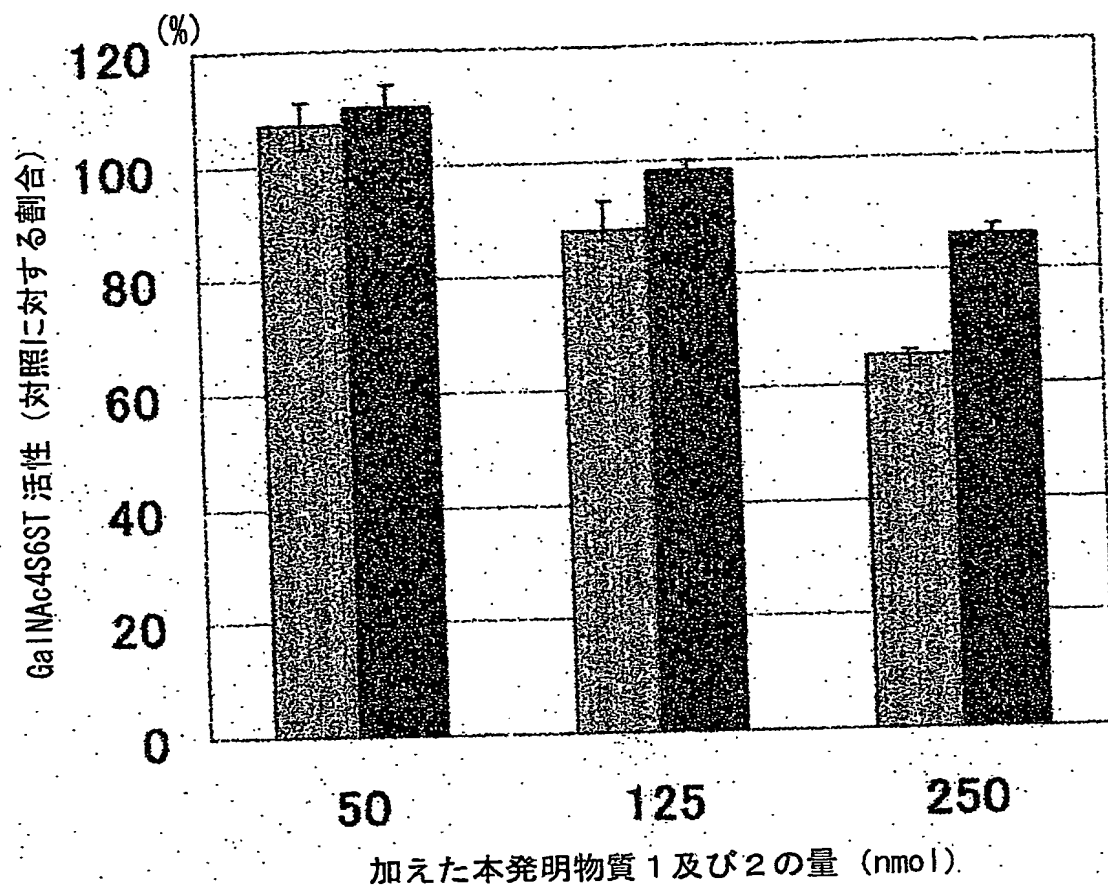
【図2】 本発明物質3及び本発明物質4のGalNAc4S6ST阻害活性を示す図である。縦縞は本発明物質3を示し、黒塗りは本発明物質4を示す。

【図3】 本発明物質5及び本発明物質6のGalNAc4S6ST阻害活性を示す図である。縦縞は本発明物質5を示し、黒塗りは本発明物質6を示す。

【書類名】

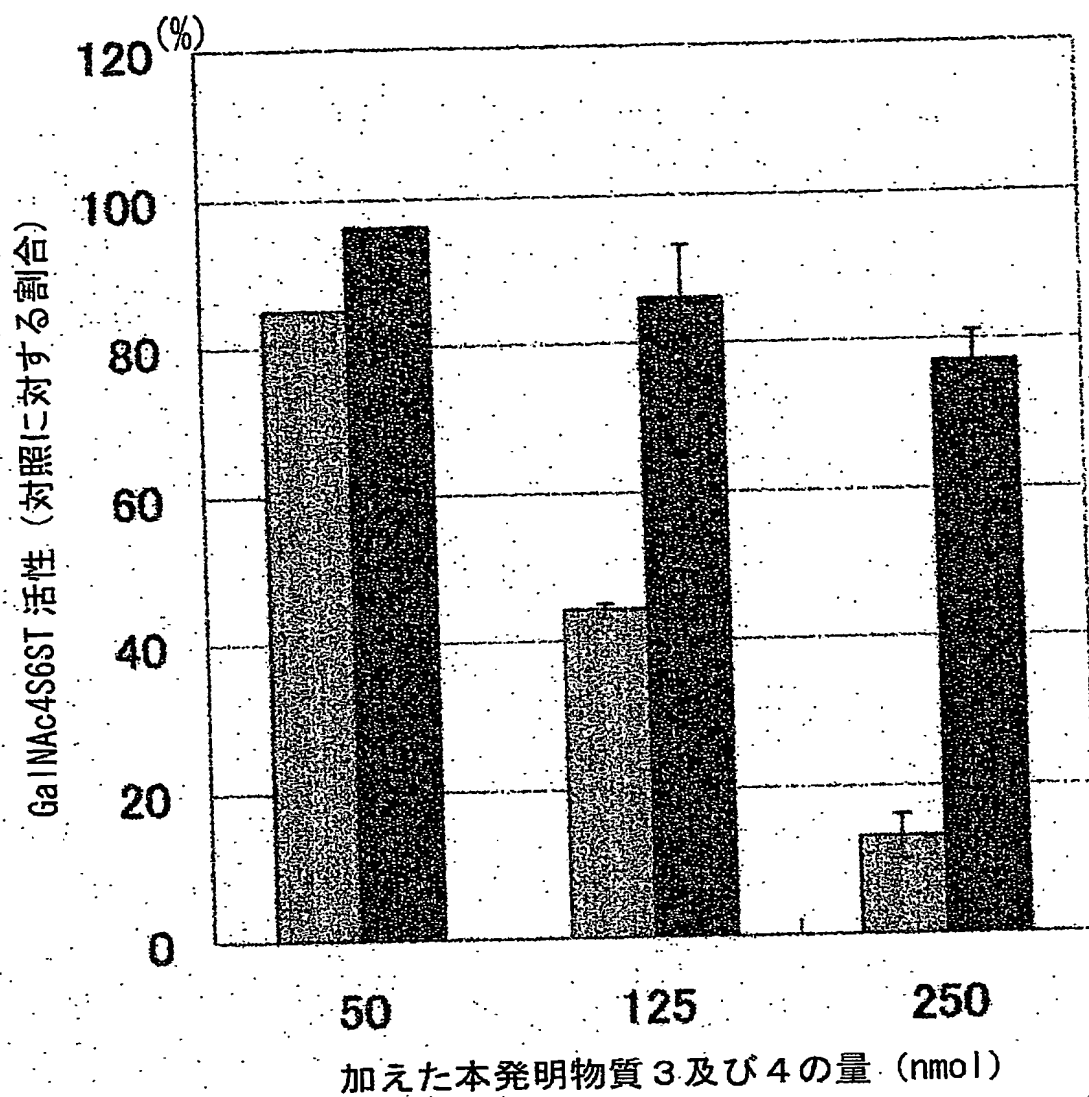
図面

【図 1】



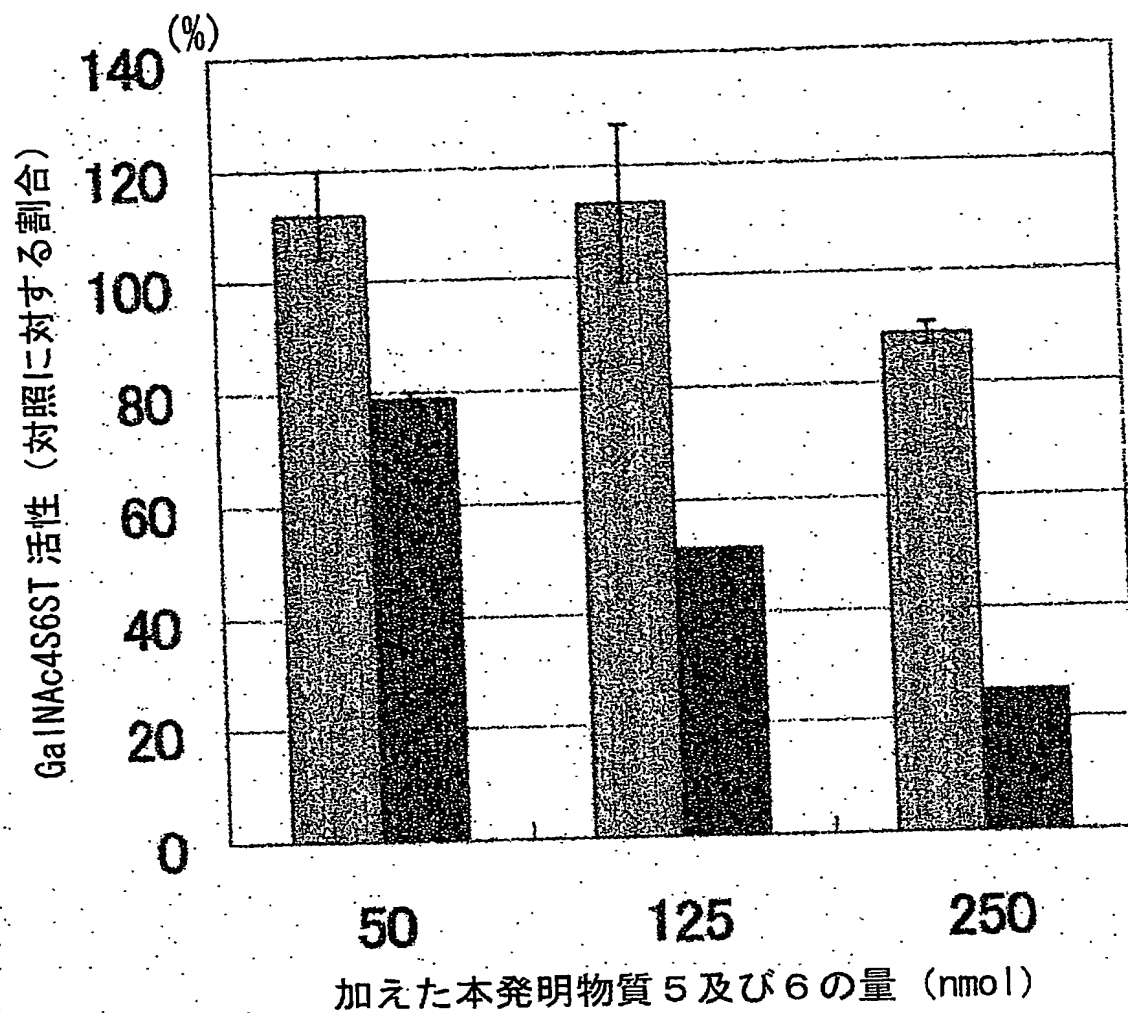
BEST AVAILABLE COPY

【図 2】



BEST AVAILABLE COPY

【図 3】



BEST AVAILABLE COPY

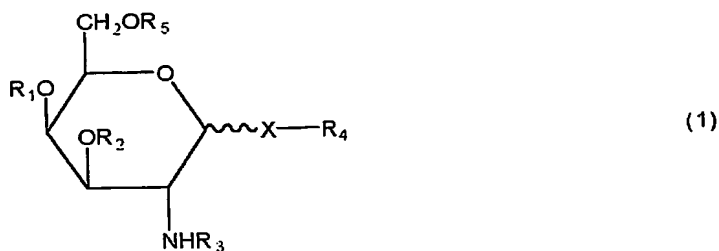
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コンドロイチン硫酸を合成する働きを有する硫酸基転移酵素の酵素活性を阻害する働きを有する化合物を提供する。

【解決手段】 下記式 1 で表されることを特徴とするガラクトサミン誘導体及び当該ガラクトサミン誘導体を硫酸基転移酵素阻害剤として使用する。

【化 1】



式中 R_1 、 R_2 及び R_5 は各々独立に SO_3^- 又は H を示し少なくとも何れかは SO_3^- を示し、 R_3 は H 、アセチル基又は SO_3^- を示し、 R_4 は H 、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラルキル基を示し、 X は O 、 S 、 NH 、又は CH_2 を示す。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2002-382122

受付番号

50201992021

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0094

作成日

平成15年 2月19日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年12月27日

次頁無

特願 2002-382122

出願人履歴情報

識別番号

[000195524]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

1990年 8月20日

新規登録

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
生化学工業株式会社